MARIA GABRIELA XAVIER DE OLIVEIRA

Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves comercializadas no Município de São Paulo - SP

São Paulo
2015

MARIA GABRIELA XAVIER DE OLIVEIRA

Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de
aves comercializadas no Município de São Paulo - SP

São Paulo
2015

MARIA GABRIELA XAVIER DE OLIVEIRA

Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves
comercializadas no Município de São Paulo - SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3241
FMVZ

Oliveira, Maria Gabriela Xavier de
Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves comercializadas no Município de São Paulo - SP / Maria Gabriela Xavier de Oliveira. -- 2015.
63 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. *Arcobacter*. 2. Avicultura. 3. Zoonoses. 4. Segurança dos alimentos. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 21 de setembro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves e suínos comercializadas no Município de São Paulo - SP", protocolado sob o CEUA nº 4686280114, sob a responsabilidade de Terezinha Knöbl, foi aprovado na reunião de 13/05/2015, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Genotypic characterization of *Arcobacter* spp. isolated from poultry and pig meat marketed in São Paulo - SP", protocol number CEUA 4686280114, under the responsibility Terezinha Knöbl, was approved in the meeting of day 05/13/2015, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIVEIRA, Maria Gabriela Xavier de

Título: Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves comercializadas no Município de São Paulo - SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial a minha tia Maria Cristina, que sempre me incentivou à dedicação no mundo acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e incentivo em todas as etapas da graduação e pós-graduação.

À CAPES e FAPESP (2014/06584-7) pelo financiamento da pesquisa.

À Professora Doutora Terezinha Knöbl, pela dedicação, orientação, carinho e por acreditar em nosso trabalho, além de persistir no universo da pesquisa com tanta garra e envolvimento.

À professora Doutora Andrea Micke Moreno, por permitir o desenvolvimento de nosso trabalho no Laboratório de Sanidade Suína, nos acolhendo com carinho e atenção; e pela dedicação no desenvolvimento deste e de outros trabalhos.

A toda equipe do Laboratório de Sanidade Suína (Ana Paula, Luisa, Rosilma, Vasco, Carlos, Bárbara, Pedro, Givago, Alexandre, Thaís, Ketrin, Jucelia, Maria Roberta, Fabiana e Maria) pelo companheirismo e atitudes de cooperação, que de alguma forma permitiram o perfeito andamento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Aviária (Marcos, Mirela, Jéssica, Lilian, Rosely, Yamê, Maria Flávia e Letícia) por permitirem a minha participação em uma equipe tão dedicada, atenciosa e com enorme potencial de crescimento científico.

À Doutora Simone Balian, por toda atenção e carinho especial neste período; e à equipe do Laboratório de Higiene Alimentar, com atenção especial à Sandra, que sempre esteve presente nas etapas da graduação e pós-graduação.

Ao Jason Onell Ardila Galvis, pela confecção do mapa epidemiológico descrito na dissertação e a Luisa Zanolli Moreno pelo auxílio em diversos momentos da elaboração deste e de outros trabalhos.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Patologia e do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, em especial à Adriana Margarido e Milena Oliveira por toda a atenção dispensada e por sempre me recepcionarem com alegria.

A todos os estagiários que estiveram no laboratório e que de alguma forma colaboraram para a execução do trabalho, compartilhando informação e conhecimento adquirido em todos esses anos de dedicação.

“Sei que há somente um Deus vivente, verdadeiro e infinito, criador e mantenedor de todas coisas visíveis e invisíveis, cuja essência está difundida em todo o universo e cuja mente e consciência constituem a alma do Homem”.

Harvey Spencer Lewis

“Quando a alma está feliz, a prosperidade cresce, a saúde melhora, as amizades aumentam, enfim, o mundo fica de bem com você... O mundo exterior reflete o universo interior”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

OLIVEIRA, M. G. X. de. **Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves comercializadas no Município de São Paulo – SP**. [Genotypic characterization of *Arcobacter* spp. isolated from poultry meat sold in the city of São Paulo - SP]. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Arcobacter spp. é um micro-organismo Gram negativo que provoca diarreia aquosa e sepse em seres humanos. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são espécies patogênicas para humanos. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Arcobacter* spp. na carne de aves comercializadas em açougues na cidade de São Paulo, verificando os genes de virulência e o perfil genotípico. Um total de 300 cortes de carne de frango foram submetidos ao cultivo e isolamento sob condições aeróbicas, a 30°C por 72 horas. Colônias suspeitas de *Arcobacter* spp. foram selecionadas para a detecção molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de determinar as espécies e os genes de virulência. Os resultados revelaram a presença de *Arcobacter* spp. em 18,3% (55/300) de amostras de carne de aves, sendo identificado como *A. butzleri* 63,6% (35/55) e *A. cryaerophilus* 36,3% (20/55). Os genes de virulência pesquisados demonstraram positividade de 100% (55/55) para o *ciaB* e *mvn*, seguidos de *cj1349* 98,1% (54/55), *pldA* 94,4% (52/55), *cadF* 72,7% (40/55), *tlyA* 92,7% (51/55), *hecA* 49% (27/55), *irgA* 47,2% (26/55) e *hecB* 34,5% (19/55). Estas cepas foram submetidas ao AFLP gerando dois dendogramas. Foram identificados 19 perfis genotípicos para *A. butzleri* e 17 para *A. cryaerophilus*. Os resultados desta pesquisa apontam a presença de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* na fase final da distribuição de carne de frangos nos açougues. A falta de inocuidade dos alimentos de origem animal, bem como a presença de estirpes virulentas representam riscos de Saúde Pública, com especial atenção para a possibilidade de contaminação cruzada gerados por alimentos crus e utensílios de cozinha.

Palavras-chave: *Arcobacter*. Avicultura. Zoonoses. Segurança dos alimentos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. G. X. de. **Genotypic characterization of *Arcobacter* spp. isolated from poultry meat sold in the city of São Paulo - SP.** [Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves comercializada no Município de São Paulo -SP]. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Arcobacter spp. is a Gram negative microorganism that causes watery diarrhea and septicemia in humans. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii* are pathogenic for humans. The aim of this study was to detect the presence of *Arcobacter* spp. in poultry meat from butcher shops in the city of São Paulo, checking the virulence genes and profile genotypic. A total of 300 chicken cuts were used for cultivation and isolation in broth and JM agar, under aerobic conditions, at 30 °C for 72 hours. *Arcobacter* colonies were selected and submitted to molecular detection by polymerase chain reaction (PCR), in order to determine species and virulence genes. Results show the presence of *Arcobacter* spp. in 18.3% (55/300) of poultry meat samples, identified as *A. butzleri* 63.6% (35/55) and *A. cryaerophilus* 36.3% (20/55) in chicken isolates. The virulence genes on *Arcobacter* spp. researched demonstrated positive these 100% (55/55) for *ciaB* and *mvN*, followed by *cj134998*, 1% (54/55), *pldA* 94,4% (52/55), *cadF* 72.7% (40/55), *tlyA* 92,7% (51/55), *hecA* 49% (27/55), *irgA* 47,2% (26/55) and *hecB* 34,5% (19/55). These strains were submitted to AFLP generating two dendogramas. Nineteen profiles genotypins were obtained for *A. butzleri* and seventeen for *A. cryaerophilus*. The results of this research point to the presence of *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in the final stage of distribution of poultry meat to butcher shops. The lack of safety of food of animal origin, as well as the presence of virulent strains pose risks to Public Health, with special focus on cross contamination risks generated by uncooked food and utensils.

Keywords: *Arcobacter*. Aviculture. Zoonoses. Food safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia eletrônica de <i>A. skirrowii</i> LMC 6621 em cultivo celular (Caco-2).....	19
Figura 2 -	Colônias de <i>Arcobacter butzleri</i> isoladas no meio Johnson e Murano (JM).....	31
Figura 3 -	Perfil de bandas de <i>Arcobacter</i> spp. submetidos ao AFLP.....	35
Figura 4 -	Número de cepas positivas para <i>A. butzleri</i> e <i>A. cryaerophilus</i>	36
Figura 5 -	Distribuição de <i>A. butzleri</i> (vermelho) e <i>A. cryaerophilus</i> (verde) nas regiões Sul, Oeste, Norte, Leste e Centro do Município de São Paulo.....	38
Figura 6 -	Perfis genotípicos de <i>A. butzleri</i> detectados em amostras de carnes de frangos provenientes de açougues do município de São Paulo.....	43
Figura 7-	Perfis genotípicos de <i>A. cryaerophilus</i> detectados em amostras de carnes de frangos provenientes de açougues do município de São Paulo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características bioquímicas de <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> e <i>A. skirrowii</i>	21
Tabela 2 -	Cepas de <i>Arcobacter</i> detectadas a partir de 300 cortes de carne de frango.....	37
Tabela 3 -	Número de cepas positivas para genes de virulência.....	39
Tabela 4 -	Ocorrência (número=n) dos genes de virulência em <i>A. butzleri</i> e <i>A. cryaerophilus</i>	40
Tabela 5 -	Perfis de virulência de acordo com a combinação de nove genes pesquisados.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para diferenciação das espécies.....	32
Quadro 2 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para detecção dos genes de virulência.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CADEIA DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM AVIARIA	16
2.2	<i>Arcobacter</i> spp.	18
2.2.1	Epidemiologia da Arcobacteriose	18
2.2.2	Patogenia em aves e humanos	23
2.2.3	Fatores de Virulência	25
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	CULTIVO E ISOLAMENTO BACTERIANO	30
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA	31
4.3	DETECÇÃO DAS ESPÉCIES	32
4.4	DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	32
4.5	POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	34
5	RESULTADOS	36
5.1	ISOLAMENTO DE CEPAS E DETECÇÃO MOLECULAR	36
5.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA de <i>Arcobacter butzleri</i> e <i>Arcobacter cryaerophilus</i> NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO	37
5.3	DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	39
5.4	POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	41
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Com o grande avanço tecnológico, disponibilidade de insumos, capacidade de exploração e produção de alimentos de origem animal, o Brasil tornou-se um dos principais polos comerciais de carne de frango em sistema integrado do mundo (RODRIGUES, 2014). Atualmente o país encontra-se como primeiro maior exportador mundial de carne de frango (ANIMAL ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA (ABPA), 2014). No entanto, para manter a taxa de crescimento e valorização, o setor deve estar atento ao aumento das exigências dos consumidores, em vários quesitos, dentre os quais se destacam a qualidade sanitária dos plantéis e a segurança dos alimentos de origem animal (MENDES, 2011; ESMAILE et al., 2014)

A presença de certas espécies de bactérias do gênero *Arcobacter* spp. em alimentos de origem animal pode representar um perigo biológico para os consumidores, em determinadas circunstâncias que favorecem a ocorrência de infecções alimentares. Embora o potencial do agente em causar doenças de transmissão alimentar seja conhecido, existem poucos estudos epidemiológicos envolvendo este gênero bacteriano no Brasil (NEUBAUER; HESS, 2006).

A epidemiologia do agente também é pouco esclarecida, contudo sabe-se que a principal via de transmissão de *Arcobacter* spp. para seres humanos é a ingestão de alimentos de origem animal e de água contaminados. É encontrado com maior frequência em carnes de aves e de suínos, aumentando o risco de infecção se os produtos forem consumidos crus ou mal cozidos, uma vez que sobrevivem a temperatura até 4°C e são inativados em poucos segundos à 55°C (ATANASSOVA et al., 2008; HAMILL; NEILL; MADDEN, 2008). Kabeya et al. (2004) e Ho, Lipman, e Gaastra, (2008) defendem a hipótese de que as carcaças de frangos e suínos são contaminadas após o abate, em etapas como a escalda. As taxas de isolamento a partir de carnes de frango costumam ser mais elevadas que a de suínos (KABEYA et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi isolar cepas de *Arcobacter* spp. a partir de recortes de frangos comercializados no Município de São Paulo, identificando as espécies patogênicas, os fatores de virulência e os genótipos circulantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a Associação Brasileira de proteína Animal – ABPA (2015) o Brasil ocupa o primeiro lugar como exportador de carne de frango e se mantém entre os três principais produtores mundiais no setor avícola. O consumo per capita entre os anos de 2000 e 2014 no país aumentou de 37,4 para 42,7 Kg/ habitante/ ano, respectivamente.

Visando a importância do setor e do esclarecimento de alguns pontos da cadeia produtiva de frangos, principalmente os relacionados à sanidade, a seguir serão descritos os principais temas relacionados à avicultura e características importantes de *Arcobacter* spp. como agente patogênico.

2.1 CADEIA DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM AVIARIA

Com os progressos da tecnologia de produção, instalações, genética, nutrição e manejo, a avicultura industrial tornou-se uma importante atividade do setor agropecuário brasileiro, gerando grande renda econômica (TINÔCO, 2001).

Desde 1970, a avicultura brasileira consolidou a produção de carnes e ovos como fonte econômica mundial. No início do século XXI o Brasil tornou-se um dos maiores exportadores mundiais (BELUSSO; HESPANHOL, 2010) e atualmente o setor avícola encontra-se como terceiro maior produtor e primeiro maior exportador mundial, gerando em 2014 um total de 10.977 toneladas de produtos exportados (ANIMAL ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA (ABPA), 2014).

A UBA (União Brasileira de Avicultura) vem realizando campanhas de incentivo ao consumo de carne de frango no mercado interno, destacando a qualidade do produto, desfazendo mitos relacionados ao uso de hormônios e reforçando as vantagens da criação intensiva com ciclo rápido de aproximadamente 40 dias (GRAV et al., 1992).

Em relação à política do comércio exterior, desde 1966 é utilizado um regime aduaneiro de *Drawback* (presente nos arts. 383 a 493 do Regulamento Aduaneiro, instituído pelo Decreto nº 6759 de 05.02.2009, com consolidação e procedimentos

regulamentados pela Portaria Secex nº 23, de 14.07.2011) que visa estimular as exportações sem impostos, além de estimular e contribuir na produtividade do mercado interno, mantendo preços e rentabilidade dos produtores rurais (ANIMAL ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA (ABPA), 2014).

Com alta produtividade e bom desempenho, o setor avícola adquiriu tecnologia genética, nutrição e manejo especializado, para atingir índices zootécnicos desejáveis e atender à demanda comercial. Contudo, o setor ainda enfrenta alguns desafios relacionados à sanidade, o que pode levar ao comprometimento de lotes inteiros acometidos por diferentes enfermidades (DUARTE et al., 2009). Muitos agentes ainda são controlados pelo uso de promotores de crescimento medicamentosos, como antimicrobianos, utilizados em doses subterapêuticas com finalidade preventiva (ROSSI et al., 2007).

Outras medidas vêm sendo realizadas ao longo destes anos visando melhoras na produção, incluindo a geração de linhagens resistentes às doenças, nutrição adequada e cuidados na biossegurança dos criatórios. Entretanto, ainda há riscos de contaminação nos aviários devido à exposição das aves a fatores exógenos, como a água de bebida (JUNIOR et al., 2007).

Em 1994, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), desenvolvendo programas sanitários para controle da doença de Newcastle, Salmoneloses e Micoplasmoses dos plantéis reprodutores de aves comerciais. Estas enfermidades passaram a ser de notificação obrigatória e a presença desses agentes nas granjas resulta na adoção de medidas de defesa sanitária, que muitas vezes incluem o sacrifício de animais portadores. Estas enfermidades também atuam como barreiras sanitárias para o comércio internacional de carnes, e da mesma forma, os surtos devem ser notificados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), prejudicando as exportações (BRASIL, 2009).

A inocuidade dos alimentos e prevenção contra doenças é o objetivo mundial de todos os governos, entretanto há muitas limitações da inspeção tradicional e da amostragem/análise de lotes que consiga garantir a segurança dos alimentos em 100% dos produtos (ICMSF, 2006).

Para minimizar os perigos que possam existir, criou-se medidas de parâmetro como o FSO – Food Safety Objective e PO - Performance Objective, para que sejam estabelecidas as metas de inocuidade de alimentos. FSO não especifica uma meta

da cadeia produtiva, mas permite que cada indústria processe seus produtos da maneira mais adequada, especificando o nível máximo de perigo. Já o PO estabelece uma meta entre a cadeia produtiva e o consumidor, como por exemplo, a determinação de ausência de *Salmonella* spp. em carnes de frango, reduzindo a probabilidade de contaminação cruzada em alimentos não cozidos (ICMSF, 2006).

Contudo as diversas etapas envolvidas na produção, processamento e armazenamento de frangos no comércio e nas casas dos consumidores, podem ser importantes vias de contaminação dos alimentos. A boa qualidade da água e alimentos fornecidos para as aves, programas de monitoria dos plantéis para agentes emergentes, cuidados na manutenção de frigoríficos e açougues são necessários para minimizar problemas relacionados a biossegurança na cadeia produtiva de aves (SILVEIRA et al., 2008).

2.2 *Arcobacter* spp.

A seguir são descritos características relevantes de *Arcobacter* spp.

2.2.1 Epidemiologia da Arcobacteriose

O gênero *Arcobacter* foi proposto por Vandamme et al. (1992a). Até a presente data são descritas e reconhecidas 20 espécies do gênero (LEVICAN et al., 2015), sendo publicados mais recentemente: *A. anaerophilus*, isolado de sedimentos estuários em Gangasagra na Índia (SASI JYOTHSNA et al., 2013), *Arcobacter ebronensis* e *Arcobacter aquimarinus*, obtidos de mexilhões e água do mar no Chile (LEVICAN et al., 2015) e *Arcobacter lanthieri*, provenientes de um estudo de diversidade e prevalência do agente, utilizando fezes e dejetos de suínos e bovinos (WHITEDUCK-LÉVEILLÉE et al., 2015).

Os primeiros estudos de identificação foram realizados visando à identificação de bactérias da família Campylobacteriaceae em dois grupos: *Campylobacter fetus*, pertencendo ao Grupo “1”, e os demais isolados suspeitos (atual *Arcobacter* spp.) classificados como “Grupo 2”, por apresentar o agente *Campylobacter* com

características de aero tolerância (ELLIS et al., 1977¹ *apud* VANDENBERG et al., 2004, p. 1863).

A família Campylobacteraceae inclui as bactérias dos gêneros *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Arcobacter*. Trabulsi; Alterthum (2008) propõe que esta família seja constituída pelos gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*, sendo que os dois primeiros gêneros possuem espécies patogênicas para o homem e para os animais, enquanto o último está presente em ambientes aquáticos.

O gênero *Arcobacter* pertence a superfamília VI das Proteobacterias que também inclui os gêneros *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* e *Flexispira*. *Arcobacter* spp. representa um grupo de bactérias com características distintas em sua forma de multiplicação, uma vez que a temperatura de crescimento ótima ocorre à 30°C (variação de temperatura entre 15°C e 37°C), em atmosfera aeróbica ou micro aeróbica (VANDAMME et al., 1992b).

São micro-organismos Gram negativos, não esporulados e curvos, com aproximadamente 0.2-0.9 µm de largura por 0.5-3 µm de comprimento, e apresentam-se como oxidase-positivos e incapazes de oxidar ou fermentar os hidratos de carbono, ou seja, obtém sua energia à partir de aminoácidos ou intermediários do ciclo de ácido tricarboxílico (Figura 1) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A maioria das espécies possui um único flagelo polar, que confere capacidade de motilidade e, como referido anteriormente, são capazes de crescer sob condições microaeróbicas ou aeróbicas, com a exceção de *A. anaerophilus*, que não tem flagelos e é um anaeróbio restrito (SASI JYOTHSNA et al., 2013).

Figura 1- Fotografia eletrônica de *A. skirrowii* LMC 6621 em cultivo celular (Caco-2)

Fonte: (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006).

¹ ELLIS, W. A.; NEILL, S. D.; O'BRIEN, J. J.; FERGUSON, H. W.; HANNA, J. Isolation of *Spirillum/Vibrio-like* organisms from bovine fetuses. Vet Rec, p. 100:451-2, 1977.

Os primeiros isolados de *Arcobacter* spp. foram obtidos por Ellis et al. (1977)² *apud* Vandenberg et al. (2004, p. 1863) a partir de fetos bovinos abortados, contudo na época ainda não havia uma classificação em gênero e espécie. Quatorze anos após, realizou-se pesquisa na Georgia nas quais foram obtidos isolados do agente provenientes de fezes de humanos e animais com diarreia, abortos de suínos, ovinos, bovinos e do prepúcio de touros. Estes isolados foram denominados *Campylobacter butzleri* e *Campylobacter cryaerophila* (KIEHLBAUCH et al., 1991).

O gênero *Arcobacter* spp., assim como a espécie *A. cryaerophilus* foram propostos por Vandamme et al. (1992a). Um ano após surgiram as espécies *Arcobacter nitrofigilis*, *A. butzleri* e *A. skirrowii* pesquisadas por Vandamme et al. (1992b).

Os primeiros isolados de *Arcobacter halophilus* e *Arcobacter cibarius* foram obtidos em 2005, a partir de amostras de água de uma lagoa hipersalina no Havaí e de carcaças de frangos da Bélgica, respectivamente (DONACHIE et al., 2005; HOUF et al., 2005).

Durante um estudo sobre a prevalência de abortos em suínos e contaminação de produtos de origem animal, utilizaram-se amostras de fígado e rim de fetos abortados de suínos, nos quais foram isoladas 5 espécies de *Arcobacter*, dentre elas uma nova espécie denominada *Arcobacter thereius* (HOUF et al., 2009). Ainda relacionado a isolados provenientes de animais de produção, foi identificado *Arcobacter tropharium* a partir de fezes de suínos de engorda na Bélgica (DE SMET et al., 2011) e *Arcobacter suis*, em amostras de carnes de porcos (LEVICAN; COLLADO; FIGUERAS, 2013).

Com a finalidade de detectar marcadores biológicos indicadores de poluição ambiental, foram obtidas cepas selvagens a partir de amostras de esgotos, propondo as espécies *Arcobacter defluvii* (COLLADO et al., 2011) e *Arcobacter cloacae*, sendo que esta foi encontrada também em mexilhões (LEVICAN; COLLADO; FIGUERAS, 2013).

A partir de amostras de ambiente marinho foram encontrados na Califórnia, *Candidatus Arcobacter sulfidicus* (não reconhecido formalmente) (WIRSEN et al., 2002) e *Arcobacter marinus* na Coreia (KIM; HWANG; CHO, 2010). Amostras de ostras, mariscos e mexilhões foram utilizadas para determinação das espécies:

² ELLIS, W. A.; NEILL, S. D.; O'BRIEN, J. J.; FERGUSON, H. W.; HANNA, J. Isolation of *Spirillum/Vibrio-like* organisms from bovine fetuses. Vet Rec, p. 100:451-2, 1977.

Arcobacter mytili (COLLADO et al., 2009), *Arcobacter molluscorum* (FIGUERAS et al., 2011a), *Arcobacter ellisii* (FIGUERAS et al., 2011b), *Arcobacter bivalviorum* e *A. venerupis* (LEVICAN et al., 2012).

A diversidade e expansão do gênero vêm aumentando consideravelmente, assim como estudos relacionados à resistência antimicrobiana e troca de genes plasmidiais. Harrass, Schwarz e Wenzel (1998) identificaram plasmídeos de 5kbp em 21 de 89 isolados de *A. butzleri*, advindos de frangos recém abatidos. Doudah et al. (2014) descreveram a presença de 9,9% de plasmídeos relacionados a replicação, mobilização e genes relacionados ao sistema de secreção Tipo IV em 273 amostras de *Arcobacter* provenientes de fezes de humanos e animais.

Arcobacter butzleri, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, *Arcobacter cibarius*, *Arcobacter thereius* e *Arcobacter trophiarum* têm sido isolados em animais do mundo inteiro e em produtos de origem animal, reforçando os riscos biológicos (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006; VAN DEN ABEELE et al., 2014)

As espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são as únicas consideradas patogênicas para relação homem-animal (SILVEIRA et al., 2008). Observou-se que estas espécies apresentam características bioquímicas e de crescimento diferentes das outras espécies (Tabela 1):

Tabela 1 - Características bioquímicas de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*

Característica	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	V
Redução de nitrato	+	+	+
Hidrolise acetato indoxil	+	+	+
4% (W/V) NaCl	-	-	+
Aerobiose (25°C)	+	+	+
Cresc.em MacConkey	+	V	-

Fonte: Adaptado de (ARIAS; CID; FERNANDÉZ, 2011).

A presença das três espécies caracterizadas como zoonóticas está associada à doença em seres humanos e de animais, revelando risco à Saúde Pública (DOUIDAH et al., 2012). A principal forma de transmissão ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados, sendo *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* os principais

micro-organismos associadas às desordens gastrointestinais e sepse em pacientes imunodeprimidos (DE OLIVEIRA et al., 1999).

Estudos sobre a epidemiologia, caráter zoonótico de *Arcobacter* e os fatores envolvidos na patogenia da arcobacteriose têm se intensificado nos últimos anos, mas ainda não estão completamente estabelecidos todos os pontos da cadeia de transmissão e contaminação. Sabe-se que a transmissão dessa bactéria aos seres humanos é por via fecal-oral através do contato direto com reservatórios animais, ingestão de água e alimentos de origem animal contaminados. Há ainda o perigo de contaminação cruzada na manipulação de objetos para preparo de alimentos na indústria e no ambiente doméstico (WESLEY; HARMON, 1997; HO; LIPMAN; GAASTRA, 2008).

O HACCP (Análise de Risco e Pontos Críticos de Controle) trouxe uma grande contribuição para a produção de alimentos seguros, uma vez que identifica determinados perigos em um alimento, com alguma probabilidade de afetar a Saúde Pública. Contudo ainda não é possível correlacionar a eficiência das medidas corretivas com o nível de proteção à saúde, como, por exemplo, a redução da incidência das doenças de origem alimentar em um país (ICMSF, 2006).

Assim como *Campylobacter*, uma elevada taxa de isolamento de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* é observada em carcaças de frangos em ambiente de mercados e abatedouros (HOUF et al., 2002a). Contudo a bactéria é raramente detectada no conteúdo intestinal de frangos, assim, provavelmente, a contaminação da carne resulta de outras fontes e ocorre durante o processamento (ATABAY; CORRY, 1997).

Um estudo realizado na Bélgica monitorou as vias de contaminação dos produtos em abatedouros e descartou a água como via de transmissão. As amostras de carcaças, intestino, fezes de frangos e dos equipamentos foram positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* ou *A. skirrowii*. A diversidade genética das cepas encontradas no estudo pode ser devida a contaminação cruzada entre animais abatidos de diferentes lotes. As fontes originais de contaminação de carcaças e o modo pelo qual a contaminação se espalha no abatedouro não foram determinados (HOUF et al., 2002a).

Técnicas moleculares para identificar e diferenciar a diversidade genética, assim como as formas de transmissão de *Arcobacter* vem se expandindo nos estudos epidemiológicos. A técnica mais utilizada para o agente com esta finalidade

é o ERIC-PCR, principalmente para amostras de alimentos e de água, e para investigação de novas espécies (HOUF et al., 2002b; COLLADO et al., 2010). No entanto, a aplicação de outras técnicas como AFLP, PFGE, m-PCR, 16S rRNA, RFLP e sequenciamento do gene 16S tem favorecido a descoberta de um maior número de espécies e dos locais de origem de isolamento das mesmas (COLLADO; FIGUERAS, 2011).

2.2.2 Patogenia em aves e humanos

Arcobacter spp. são bactérias emergentes com potencial patogênico, sendo que sua via de transmissão principal inclui alimentos de origem animal, como frangos, carnes bovina, suína, cordeiro e queijos (HOUF et al., 2004; HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006; SERRAINO et al., 2013).

As espécies capazes de causar a doença nos seres humanos e na maioria dos animais mamíferos são *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirowii* e *A. cibarius* (VAN DRIESSE; HOUF, 2007). Estas podem ser encontradas em órgãos reprodutivos, mastites e fetos abortados de diversas espécies, como bovinos e suínos. Uma das principais causas de estudo deste agente está relacionado à sua capacidade de provocar diarreia persistente e sepse em seres humanos e em alguns animais (LEVICAN et al., 2013).

A infecção nas aves pelo *Arcobacter* spp. não cursa sinais clínicos aparentes e por isso é difícil realizar o diagnóstico nas granjas. Em diversas suposições, a contaminação ocorre por via horizontal, pelo contato de organismos externos como água de bebida, manipulação das pessoas, animais sinantrópicos ou ainda equipamentos utilizados na granja. A transmissão vertical para os ovos ainda não foi comprovada (LIPMAN; HO; GAASTRA, 2008; DE SMET et al., 2011).

O mecanismo pelo qual esses organismos podem se espalhar e contaminar o meio ambiente e a carcaça não foram completamente elucidados. Sugere-se que a temperatura corporal das aves não seja um ambiente favorável à sobrevivência do agente, mas a bactéria pode passar pelo trato digestório destes animais e contaminar o ambiente. Em trabalhos experimentais, em que se realizou a inoculação via oral de *Arcobacter* em pintinhos, observou-se a presença do micro-

organismo nas fezes destes animais, mas não foram identificadas lesões em órgãos ou colonização intestinal (EIFERT et al., 2003).

Com a finalidade de estabelecer possíveis achados de diferentes espécies de *Arcobacter* em frangos, Lipman, Ho e Gaastra (2008) realizaram uma avaliação de conteúdo intestinal (íleo e ceco), ovos e oviduto de poedeiras (magnum e folículo ovariano) sem sinais de diarreia. Os autores observaram a presença do agente no trato reprodutivo e no intestino dos animais avaliados, todavia não obtiveram amostras positivas para os ovos.

O ciclo de transmissão do agente para os seres humanos ocorre pela ingestão do alimento cru ou mal cozido contaminado. O agente irá colonizar e se multiplicar no epitélio intestinal, onde irá iniciar o processo de infecção e aparecimento de sinais ou sintomas (COLLADO; FIGUERAS, 2011).

A primeira evidência sugerindo uma relação epidemiológica entre *A. butzleri* e doença humana foi derivada de um estudo de surtos de cólicas abdominais recorrentes que ocorreram em uma creche e em uma escola primária na Itália (VANDAMME et al., 1992a).

Em geral, os principais achados clínicos incluem diarreia sanguinolenta, febre e dor abdominal. Alguns pacientes podem apresentar vômito associado a um dos sinais descritos (FERREIRA et al., 2014a). Um estudo experimental utilizando cepas de *Arcobacter* spp. em células epiteliais do cólon de humanos revelou sua capacidade de produzir uma disfunção da barreira do intestino, levando a um tipo de vazamento de fluxo e provocando uma diarreia aquosa (COLLADO; FIGUERAS, 2011).

No Sul da África foram identificados 7% de crianças com diarreia provocada por *A. butzleri*. Metade destes pacientes apresentou lactoferrina circulante, o que pode indicar o poder inflamatório do agente (SAMIE et al., 2007).

Em 2013 na Espanha, um jovem de 26 anos apresentou um quadro de diarreia aquosa sanguinolenta e dor abdominal com duração de 3 semanas, sendo que na amostra de fezes foi detectado *A. cryaerophilus*. O paciente se recuperou dos sintomas, mas foram realizados exames de monitoria, pois o mesmo relatou que comia regularmente carne e peixe cru, e também tinha um cão em casa e um grupo de galinhas poedeiras no seu quintal. Os animais também foram monitorados, mas nenhum apresentou positividade para o agente (FIGUERAS et al., 2014).

Para avaliar a prevalência de *Arcobacter* associada à diarreia em humanos é preciso estabelecer parâmetros como a idade, sexo, região geográfica de procedência da amostra, patogenicidade do agente e estado imunológico do indivíduo infectado. Ferreira et al. (2014b) pesquisaram a ocorrência e prevalência de *Arcobacter* e *Campylobacter* em fezes de pacientes com histórico de diarreia, provenientes de 22 hospitais de Portugal. Constataram que crianças (menores de 18 anos) apresentavam maior número de casos de arcobacteriose (*A. butzleri* e *A. cryaerophilus*) se comparado aos adultos.

Em contrapartida, em 2004 na Bélgica foi reportado um caso de diarreia persistente em um paciente de 73 anos com histórico de problemas na válvula cardíaca e tosse, e o mesmo foi internado por 14 dias, recebendo antibioticoterapia para resolução dos diferentes quadros clínicos. Realizaram a monitoria de possíveis patógenos causadores da diarreia nos dias 1, 2, 10 e 12, diagnosticando como agente causador *A. skirrowii*. Não foi realizado tratamento específico para a diarreia, contudo ela cessou no 10º dia de internação (WYBO et al., 2004).

2.2.3 Fatores de Virulência

Fatores de virulência são definidos como estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para a infecção bacteriana do hospedeiro. As estratégias de sobrevivência no organismo hospedeiro envolvem as etapas de adesão, colonização, invasão e produção de sideróforos ou toxinas (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008; BROOKS et al., 2012)

Até o momento, os mecanismos de patogenicidade de *Arcobacter* e seus possíveis fatores de virulência são pouco conhecidos. Visando esclarecer a patogênese do agente estudado, utiliza-se uma comparação com os fatores descritos para *Campylobacter* spp., incluindo a capacidade de invasão, adesão por proteínas de fibronectina, hemolisina e atividade citotóxica como a produção de CDT (*cytolethal distending toxin*) (ATABAY et al., 1998; HO et al., 2007; HOUF et al., 2007). Diversos estudos tem pesquisado a produção de CDT em *Arcobacter* e até o momento nenhuma cepa foi positiva para os genes dessa toxina (MURANO, 2002; HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006; FERREIRA et al., 2015).

As potenciais limitações de métodos de cultura e isolamento do agente estudado levaram ao aumento do uso de abordagens moleculares para a detecção e identificação das espécies, respectivos genes de virulência e estudos epidemiológicos (ABDELBAQI et al., 2007; GONZALEZ et al., 2012).

A determinação de alguns fatores de virulência foi essencial para o avanço na pesquisa do *Arcobacter*. Apesar de não estar completamente elucidada a expressão dos genes, foram identificados genes homólogos de *Campylobacter* em uma cepa de *Arcobacter butzleri* (ATCC 49616) e sua combinação é uma sugestão para correlacionar com a virulência do agente (DOUIDAH et al., 2012).

Os genes encontrados estão relacionados à adesão como *cadF* (proteína de fibronectina) *ecj1349* (proteína de fibronectina), invasão *ciaB* (invasão), *hecA* (filamentos de hemaglutinina que envolve ataque, agregação e morte celular), fosfolipase *pldA* (lise de eritrócitos), marcador de virulência *mvi* (biossíntese de peptideoglicano), *hecB* (codifica ativação da proteína hemolisina) e o gene de hemolisina *tlyA*. Além disso, foi descrito um gene regulador de ferro da membrana externa *irgA*, reportado em *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*, sendo que seu homólogo em *E. coli* possui importante participação em infecções do trato urinário (UPEC) (DOUIDAH et al., 2012).

O gene *hecA* codifica uma proteína membro da família de hemaglutinina filamentosa (FHA) que promove a fixação em células fagocitárias do hospedeiro (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O gene *hecA* pode ocorrer em bactérias presentes em plantas (*Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*) e também em patógenos animais (*Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp. e UPEC), sendo que sua ação é provocar o primeiro ataque, agregação e morte celular do hospedeiro (MILLER et al., 2007; KARADAS et al., 2013). Este gene foi sequenciado por ter homólogos responsáveis pela ativação do sistema de secreção tipo III em *Erwinia chrysanthemi*, um agente patogênico de plantas que realiza agregação e morte celular, antes do aparecimento dos sintomas (ROJAS et al., 2002).

Os genes *cadF* e *ecj1349* são formados por proteínas de fibronectina e estão relacionados com adesão e colonização da bactéria em células intestinais, sendo esta função primordial para sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro (KONKEL et al., 1999). O gene *cadF* induz a internalização da célula bacteriana por ativação da GTPase (DASTI et al., 2010). Dos genes de adesão é o mais frequente (LEVICAN et al., 2013).

Em uma pesquisa de fatores de virulência em diferentes fontes alimentares, foram identificados que as cepas de *A. cryaerophilus* oriundas de suínos, bovinos e frangos não apresentavam o gene *cj1349*, enquanto o gene *cadF* estava presente em 100% dos isolados de suínos (ZACHAROW, et al., 2015).

O gene *ciaB* codifica uma proteína responsável pela invasão da bactéria nas células do hospedeiro,. Foi identificado em *Campylobacter*, mas era desconhecido em *Arcobacter* (MILLER et al., 2007).

Em estudo realizado por Doudah et al. (2012) em cepas de *A. cryaerophilus* isoladas de fezes de humanos com idades variadas e com diarreia, de diferentes hospitais, e fezes e carne de frangos, suínos, bovinos, ovelhas e cavalos, o gene *ciaB* estava presente em 92,9%. Já em estudo com isolados de fezes de bovinos, ovelhas, frangos e equipamentos de manutenção de abatedouros identificou-se 86,6% cepas de *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. butzleri* positivas para este fator de virulência (KHOSHBAKHT et al., 2014).

Nesse mesmo estudo realizado por Tabatabaei et al., (2014) foi constatada a presença de um gene de fosfolipase denominado *pldA*, significativamente detectado em cepas de *A. cryaerophilus* provenientes de bovinos. Fosfolipases possuem a capacidade de degradar fosfolípidos presentes na membrana de fagossomos ou fosfolípidos presentes em outras regiões da célula do hospedeiro, apresentando papel primordial na patogênese das infecções (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O gene *pldA* codifica uma proteína que realiza a lise de eritrócitos através da hidrólise de ligações éster de acil em bactérias e fungos. Possui como característica biológica também ser estritamente dependente de cálcio para sua atuação (ISTIVAN; COLOE, 2006).

O gene *tlyA* codifica uma hemolisina ou citotoxina, normalmente encontrada em *Mycobacterium tuberculosis* e *Campylobacter* spp. (RAHMAN et al., 2015). Hemolisinas são capazes de produzir substâncias que dissolvem hemácias e células tissulares. O gene *tlyA* é frequentemente encontrado em cepas de *A. butzleri* (MILLER et al., 2007; RAHMAN et al., 2015). Possui similaridade com *Brachyspira hyodysenteriae*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis*, e é capaz de potencializar a capacidade de adesão das cepas de *Campylobacter jejuni* (SAŁAMASZYŃSKA-GUZ; KLIMUSZKO, 2008). Pesquisas indicam que *tlyA* presente em *Helicobacter pylori* diminui a aderência em células de humanos, mas

esse dado é variável em células de origem animal, devido as diferenças de morfologia dos eritrócitos entre as espécies (MARTINO et al., 2001).

O gene *hecB* codifica uma proteína responsável pela ativação da hemolisina, contudo há estudos que propõem que sua presença não está correlacionada diretamente com a hemólise (FERREIRA et al., 2014b). São normalmente encontrados em *A. butzleri* de diferentes origens e em *Arcobacter* spp. provenientes de humanos, bovinos e frangos (DOUIDAH et al., 2012).

O gene *mvN* codifica uma proteína essencial para biossíntese de peptidoglicano (KHOSHBAKHT et al., 2014). Foi identificado pela primeira vez em *Salmonella* Typhimurium, como um gene cromossomal que causa uma doença tifoide, mas se sabe que é um fator importante também para *Escherichia coli*, *Sulfurimonas denitrificans* e *Wolinella succinogenes*. Além disso, possui participação para síntese e expressão do flagelo *flg* e é essencial para o crescimento e sobrevivência bacteriana (INOUE et al., 2008; RUIZ, 2008; DOUIDAH et al., 2012).

Bactérias Gram negativas possuem mecanismos para aquisição de ferro denominados sideróforos. Proteínas de membrana externa atuam como receptoras para o complexo sideróforo-ferro, captando assim o ferro existente na célula do hospedeiro para sua sobrevivência (TIVENDALE et al., 2004). O gene *irgA* codifica um receptor de membrana exterior para enterobactina que é uma proteína ferro-reguladora encontrada em *Vibrio cholera*, além de possuir um homólogo em *E. coli*, sendo que nesse há um papel fundamental para desenvolvimento de doenças do trato urinário (GOLDBERG; DIRITA; CALDERWOOD, 1990; JOHNSON et al., 2005; TANABE et al., 2014). É encontrado em maior frequência em *A. butzleri*, principalmente quando os isolados são provenientes de amostras de seres humanos (DOUIDAH et al., 2012).

3 OBJETIVOS

- Isolar *Arcobacter* spp. a partir de recortes de carnes de frangos comercializados no Município de São Paulo.
- Identificar espécies com potencial zoonótico.
- Detectar a presença de fatores de virulência nas cepas.
- Realizar a caracterização genotípica através da técnica de AFLP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 300 recortes de carnes de frangos (peito, asa, coxa e sobrecoxa) procedentes de mercados municipais, açougues e mercados de pequeno porte do município de São Paulo. Os estabelecimentos foram selecionados nas cinco regiões do município (Norte, Sul, Leste, Oeste e Centro). Os cortes foram transportados até o laboratório sob refrigeração e processados no mesmo dia da coleta.

Para controle de qualidade dos meios e da reação em cadeia pela polimerase foram utilizadas as cepas de referência *A. butzleri* ATCC 49616, *A. cryaerophilus* ATCC 43158 e *A. skirrowii* ATCC 51132.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-CEUA e protocolado sob o número 4686280114.

4.1 CULTIVO E ISOLAMENTO BACTERIANO

Cortes de 25g de carne foram acondicionados em bolsas esterilizadas contendo 225 mL de água peptonada tamponada. As amostras foram homogeneizadas em stomacher e agitadas a velocidade média por 1 minuto. Uma alíquota de 1mL da água peptonada foi semeada em 9 mL no caldo de enriquecimento seletivo descrito por Johnson e Murano (1999) e os tubos de ensaio foram agitados por 15 segundos. Os tubos foram incubados em aerobiose por 48 horas a 30°C. Após o período de incubação, uma alíquota de 10µL do caldo foi depositada sobre uma membrana estéril de celulose (0,45µm) colocada na superfície do ágar seletivo Johnson e Murano (1999). Após uma hora, os filtros foram removidos e a placas de ágar foram estriadas e incubadas em aerobiose por 48 a 72 horas a 30°C.

Colônias pequenas, típicas, não hemolíticas foram selecionadas e submetidas à coloração de Gram, inoculadas em caldo *brain heart infusion* (BHI) semi-sólido (0,15% de ágar) e incubadas a 30° C por 48 horas (Figura 2). Os cultivos foram

examinados em microscópio de campo escuro, objetiva 40X para a observação de bactérias curvas e espiraladas, extremamente móveis. Realizaram-se testes de oxidase, catalase e crescimento em ágar MacConckey. As colônias com características de *Arcobacter* spp. foram submetidas à identificação através da reação em cadeia pela polimerase e estocadas a -80°C.

Figura 2 – Colônias de *Arcobacter butzleri* isoladas no meio Johnson e Murano (JM)

Fonte: Arquivo pessoal (2015)

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA bacteriano foi purificado pela extração baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina, junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA (BOOM et al., 1990).

4.3 DETECÇÃO DAS ESPÉCIES

As cepas selecionadas foram identificadas com os *primers* descritos por Bastyns et al. (1995); Harmon e Wesley (1996); Houf et al. (2000) e Doudah et al. (2010). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* (Quadro 1), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação à 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C.

Quadro 1 - Sequência de *primers* utilizados para diferenciação das espécies

Região	Primer	Sequência	Espécie	Pb
16SrRNA gene (HARMON; WESLEY, 1996)	Arco I Arco II	AGAGATTAGCCTGTATTGTATC TAGCATCCCCGCTTCGAATGA	<i>Arcobacter</i> spp.	1223
23SrRNA gene (BASTYNS et al., 1995)	ARCO 2 BUTZ	TTCGCTTGCGCTGACAT CTATTCAGCGTAGAAGATG	<i>A. butzleri</i>	686
23SrRNA gene (HOUF et al., 2000)	CryF CryR	TGCTGGAGCGGATAGAAGTA AACAACCTACGTCTTCGAC	<i>A. cryaerophilus</i>	395
23S rRNA gene (DOUIDAH et al., 2010)	ArcoF ButR TherR CibR SkiR	GCYAGAGGAAGAGAAATCAA TCCTGATACAAGATAATTGTACG GCAACCTCTTTGGCTTACGAA CGAACAGGATTCTCACCTGT TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG	Região conservada <i>A. butzleri</i> <i>A. thereius</i> <i>A. cibarius</i> <i>A. skirrowi</i>	2061 1590 1125 198

Fonte: Adaptado Harmon; Wesley (1996); Bastyns et al. (1995); Houf et al. (2000) e Doudah et al. (2010).

4.4 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Para a detecção dos genes de virulência foram utilizados *primers* descritos por Doudah et al. (2012), com base na sequência do genoma de *A. butzleri* ATCC 49616 depositado no GenBank [Instituto Nacional de Saúde] como RM4018 (número de acesso NC 009850) conforme ilustra o quadro 2. A PCR foi realizada utilizando-

se 5 µL do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer, 1.0 U de Taq DNA polimerase, 1X tampão de CR e água até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação à 94°C por 4 min seguidos por 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C ou 56°C e 1 min a 72°C.

Quadro 2 - Sequência de *primers* utilizados para detecção dos genes de virulência

Gene	Sequência	Descrição	Temperatura de anelamento	Amplicon (pb)
<i>cadF</i>	TTACTCCTACACCGTAGT AAACTATGCTAACGCTGGTT	Adesina	55	283
<i>pldA</i>	TTGACGAGACAATAAGTGCAGC CGTCTTTATCTTTGCTTTCAGGGA	Lise de eritrócitos	55	293
<i>tlyA</i>	CAAAGTCGAAACAAAGCGACTG TCCACCAGTGCTACTTCCTATA	Hemolisina	55	293
<i>hecB</i>	CTAAACTCTACAAATCGTGC CTTTTGAGTGTTGACCTC	Codificador de Hemolisina	55	528
<i>ciaB</i>	TGGGCAGATGTGGATAGAGCTTGGGA TAGTGCTGGTCGTCCACATAAAG	Invasão de antígenos B	56	284
<i>cj1349</i>	CCAGAAATCACTGGCTTTTGAG GGGCATAAGTTAGATGAGGTTCC	Adesina	56	659
<i>mvfN</i>	TGCACTTGTTGCAAAACGGTG TGCTGATGGAGCTTTTACGCAAGC	Marcador de Virulência	56	294
<i>irgA</i>	TGCAGAGGATACTTGGAGCGTAACT GTATAACCCCAATTGATGAGGAGCA	Regulador de Ferro	56	437
<i>hecA</i>	GTGGAAGTACAACGATAGCAGGCTC GTCTGTTTTAGTTGCTCTGCACTC	Hemaglutinina	56	537

Fonte: Adaptado Doudah et al. (2012).

A detecção dos produtos de amplificação (10 µL produto e 2µL de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação Image Master® (Amershan Biosciences), sendo os mesmos corados com Blue Green. ® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.5 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III (sítio de restrição 5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'). Para clivagem do DNA bacteriano, 4 µg de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 µL. O tubo foi incubado a 37°C por 4 horas.

Após este período, uma alíquota de 5 µL do DNA clivado foi adicionado a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2 (ADH1 5'ACG GTA TGC GAC AG3' e ADH2 5'GAG TGC CAT ACG CTG TCT CGA3'), 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80 °C por 10 minutos para realização da PCR.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µL do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do primer (HI-X), 1U de *Taq*DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. Submeteu-se as amostras à desnaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C. Realizou-se a detecção dos produtos de amplificação (20 µL produto e 5µL de tampão de corrida 6X) através da eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação Image Master (Amershan Biosciences), sendo os mesmos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

Para análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa Bionumerics (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgica) (Figura 3). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA). Foi utilizado o ponto de corte de 90% de similaridade genética para definição os perfis genotípicos (VAN BELKUM et al., 2007). Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston, (1988), para determinação do índice discriminatório.

Figura 3 – Perfil de eletroforese de *Arcobacter* spp. submetidos ao AFLP

M1 e M2= Peso molecular de 1000 pb. 2 à 28 cepas de *Arcobacter*. Fonte: Arquivo pessoal (2015)

5 RESULTADOS

A pesquisa foi realizada entre os anos de 2013 e 2015 e as coletas foram realizadas randomicamente em Mercados Municipais de São Paulo e açougues das zonas Sul, Leste, Oeste, Norte e Centro do Município de São Paulo.

5.1 ISOLAMENTO DE CEPAS E DETECÇÃO MOLECULAR

Dos 300 cortes de carnes de aves analisados, foram obtidos 55 isolados de *Arcobacter* spp. Através da detecção pela técnica de PCR convencional, confirmou-se a positividade do agente estudado em 18,3% das amostras.

Dentre as espécies propostas neste estudo, foram identificados 35/55 (63.6%) isolados de *A. butzleri* e 20/55 (36.3%) de *A. cryaerophilus* (Figura 4).

Figura 4 - Número de cepas positivas para *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*

Fonte: Arquivo pessoal (2015).

Em relação ao número de cepas detectadas nos diferentes cortes analisados, foram obtidos 17 isolados de asa, 13 de coxa, 10 de sobrecoxa e 15 de peito. A espécie *A. butzleri* estava presente em 10 amostras de asa, 8 de coxa, 8 de sobrecoxa e 9 de peito. *A. cryaerophilus* em 7, 5, 2 e 6 respectivamente nos recortes citados anteriormente (Tabela 2).

Tabela 2 - Cepas de *Arcobacter* detectadas a partir de 300 cortes de carne de frango

Número de amostras	Cortes de carnes de Frangos (n)	<i>A. butzleri</i> (n/%)	<i>A. cryaerophilus</i> (n/%)
300	Asa (75)	10/75 (13.3%)	7/75 (9.3%)
	Coxa (74)	8/74 (10.8%)	5/74 (6.7%)
	Sobrecoxa (76)	8/76 (10.5%)	2/76 (2.6%)
	Peito (75)	9/75 (12%)	6/75 (8%)
	Total=300	35/300 (11.6%)	20/300 (6.6%)

5.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Arcobacter butzleri* E *Arcobacter cryaerophilus* NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO

Não foram observadas diferenças nas frequências de ocorrência de *Arcobacter* spp. entre as diferentes regiões do Município de São Paulo. No entanto a disposição dos isolados no município apresenta-se de forma heterogênea, sendo a espécie *A. butzleri* predominante na região Sul.

Observou-se maior frequência de *A. butzleri* nas regiões Centro e Oeste. *A. cryaerophilus* estava presente no Centro, Oeste, Norte e Leste, sendo as duas últimas regiões os locais de maior ocorrência (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição de *A. butzleri* (vermelho) e *A. cryaerophilus* (verde) nas regiões Sul, Oeste, Norte, Leste e Centro do Município de São Paulo

Fonte: Arquivo pessoal. Confecção: Jason Oneal - Laboratório de Epidemiologia – VPS (2015).

5.3 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Nove genes de virulência foram pesquisados e apresentaram ocorrência de 100% (55/55) para *ciaB* e *mvnN*, 98,1% (54/55) para *cj1349*, 94,4% (52/55) para *pldA*, 72,7% (40/55) para *cadF*, 92,7% (51/55) para *tlyA*, 49% (27/55) para *hecA*, 47,2% (26/55) para *irgA* e 34,5 % (19/55) para *hecB* (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de cepas positivas para genes de virulência

Genes de Virulência	Número de cepas	
	positivas (N=55)	%
<i>ciaB</i>	55/55	100%
<i>mvnN</i>	55/55	100%
<i>cj1349</i>	54/55	98.1%
<i>pldA</i>	52/55	94.5%
<i>tlyA</i>	51/55	92.7%
<i>cadF</i>	40/55	72.7%
<i>hecA</i>	27/55	49%
<i>irgA</i>	26/55	47.2%
<i>hecB</i>	19/55	34.5%

Os fatores de virulência detectados nos 35 isolados de *Arcobacter butzleri* foram *ciaB*, *cj1349* e *mvnN* (100%); *pldA* (97,2%), *tlyA* (94,2%), *cadF* (74.2%), 45.7% *hecA* (45,7%) e *irgA* e *hecB* (40%). Para as 20 cepas de *Arcobacter cryaerophilus* os genes foram identificados em 100% para *ciaB* e *mvnN*, 95% *cj1349*, 90% para *pldA* e *tlyA*, 70% *cadF*, 60% *irgA*, 55% *hecA* e 25% para *hecB* (Tabela 4).

Tabela 4 - Ocorrência (número=n) dos genes de virulência em *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*

Genes de Virulência	Número de cepas (n)	<i>A. butzleri</i> (n=35/%)	<i>A. cryaerophilus</i> (n=20/%)
<i>ciaB</i>	55	35/35 (100%)	20/20 (100%)
<i>cj1349</i>		35/35 (100%)	19/20 (95%)
<i>hecA</i>		16/35 (45.7%)	11/20 (55%)
<i>irgA</i>		14/35 (40%)	12/20 (60%)
<i>mvnN</i>		35/35 (100%)	20/20 (100%)
<i>cadF</i>		26/35 (74.2%)	14/20 (70%)
<i>hecB</i>		14/ 35 (40%)	5/20 (25%)
<i>pldA</i>		34/35 (97.2%)	18/20 (90%)
<i>tlyA</i>		33/35 (94.2%)	18/20 (90%)

Foram realizados agrupamentos dos genes de virulência, obtendo-se 21 perfis de virulência nas 55 cepas de *Arcobacter* spp (Tabela 5).

Estas 55 cepas foram submetidas ao AFLP e os perfis de virulência identificados de G1 à G21 estão descritos e correlacionados com os isolados.

Tabela 5 - Perfis de virulência de acordo com a combinação de nove genes pesquisados

Grupo (G*)	Perfis de virulência	Arcobacter spp. (n/%)
G1	<i>ciaB, cj1349, hecA, irgA, mviN, cadF, pldA, tlyA</i>	7/55
G2	<i>ciaB, cj1349, mviN, cadF, pldA, tlyA</i>	7/55
G3	<i>ciaB, cj1349, irgA, mviN, cadF, hecB, pldA, tlyA</i>	5/55
G4	<i>ciaB, cj1349, hecA, irgA, mviN, cadF, hecB, pldA, tlyA</i>	4/55
G5	<i>ciaB, cj1349, hecA, mviN, cadF, hecB, pldA, tlyA</i>	4/55
G6	<i>ciaB, cj1349, hecA, mviN, cadF, pldA, tlyA</i>	4/55
G7	<i>ciaB, cj1349, irgA, mviN, hecB, pldA, tlyA</i>	3/55
G8	<i>ciaB, cj1349, irgA, mviN, pldA, tlyA</i>	3/55
G9	<i>ciaB, cj1349, hecA, mviN, pldA, tlyA</i>	2/55
G10	<i>ciaB, cj1349, hecA, mviN, cadF, pldA</i>	2/55
G11	<i>ciaB, cj1349, irgA, mviN, cadF, pldA, tlyA</i>	2/55
G12	<i>ciaB, cj1349, mviN, pldA, tlyA</i>	2/55
G13	<i>ciaB, hecA, mviN, cadF, pldA, tlyA</i>	2/55
G14	<i>ciaB, cj1349, hecA, mviN, hecB, pldA, tlyA</i>	1/55
G15	<i>ciaB, cj1349, mviN, cadF, tlyA</i>	1/55
G16	<i>ciaB, cj1349, mviN, hecB, pldA, tlyA</i>	1/55
G17	<i>ciaB, cj1349, mviN, hecB, tlyA</i>	1/55
G18	<i>ciaB, cj1349, mviN, cadF, hecB, pldA, tlyA</i>	1/55
G19	<i>ciaB, cj1349, hecA, irgA, mviN, cadF, pldA</i>	1/55
G20	<i>ciaB, cj1349, irgA, mviN, cadF, tlyA</i>	1/55
G21	<i>ciaB, cj1349, hecA, mviN, pldA</i>	1/55

Notas: G* – perfil de virulência.

5.4 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para investigar o potencial do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados (AFLP), as 55 cepas foram submetidas à técnica e realizou-se a análise genotípica em duas etapas, gerando um dendograma para a espécie *A. butzleri* e outro para *A. cryaerophilus*.

O índice discriminatório para *A. butzleri* foi de 0.96, sendo que este exibiu 19 padrões diferentes (Figura 6) e o de *A. cryaerophilus* foi de 0.98, com 17 perfis de virulência (Figura 7).

Nos dendogramas foram identificados com a letra A os perfis genotípicos das duas espécies juntas, com a letra B os perfis de *A. butzleri*, e C os de *A. cryaerophilus*. Foram descritos também o número da cepa (strain), espécie (species), fragmento (coxa, sobrecoxa, peito ou asa/ chicken thigh, drumstick, chest or wing), região (region) de coleta (norte, sul, leste, oeste ou centro/north, south, east, west or center), ano (year), estabelecimento de coleta (market) e perfil de virulência (virulence profile) (Figuras 6 e 7).

Figura 6- Perfis genotípicos de *A. butzleri* detectados em amostras de carnes de frangos provenientes de açougues do Município de São Paulo

Figura 7 - Perfis genotípicos de *A. cryaerophilus* detectados em amostras de carnes de frangos provenientes de açougues do Município de São Paulo.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou 300 amostras de carne de frango provenientes de 77 estabelecimentos comerciais, dentre eles mercados municipais de São Paulo e açougues das Zonas Norte, Sul, Leste, Oeste e Centro. Dos 300 cortes de carnes de aves analisados, foram obtidos 55/300 (18,3%) isolados de *Arcobacter* spp., confirmados pela técnica de PCR convencional. Em um estudo semelhante, proposto para realização de isolamento de 80 carcaças de frango provenientes de um abatedouro no Brasil, foram identificados 37 amostras positivas e destas foram isolados 48 cepas de *Arcobacter* spp., dentre as quais 41 foram identificadas como *A. butzleri*. A taxa de contaminação estimada nas carcaças foi de 46,25% (37/80). (OLIVEIRA et al., 2001). Tais resultados propõem que as contaminações desses alimentos podem ocorrer nos abatedouros e se estender até os pontos de distribuição. Os valores obtidos no comércio varejista foram menores (18,3%) que os observados por outros autores no abate (46,25%), mas independente do elo da cadeia onde ocorreu a contaminação, a presença do agente em tais proporções pode representar um risco a saúde do consumidor.

Rahimi (2014) realizou pesquisa sobre a prevalência e resistência a antimicrobianos de espécies isoladas de *Arcobacter* provenientes de carnes de frangos, patos, gansos, perdizes, perus, codornas e avestruzes comercializadas em mercados e açougues do Iran, e obteve 13,1% (71/540) de positividade para o agente, sendo que o maior valor de amostras positivas foram provenientes de carne de frango (28%). Os dados destes autores são semelhantes aos observados pelo estudo em questão.

As identificações das espécies propostas em nosso estudo resultaram em 35/55 (63.6%) isolados de *A. butzleri*, 20/55 (36.3%) de *A. cryaerophilus* e nenhuma amostra positiva para *A. skirowii* (Figura 4). A tabela 2 apresenta a distribuição das diferentes espécies de acordo com o corte da carne. As duas espécies foram identificadas em todos os cortes pesquisados (asa, coxa, sobrecoxa e peito). Para a pesquisa dos fatores de virulência e caracterização genotípica pelo Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP), foram selecionadas uma colônia de cada amostra de carne.

Em trabalho realizado por Khoshbakht et al. (2014), foram pesquisados a presença de diferentes espécies de *Arcobacter* em amostras de carcaças de aves, equipamentos e instalações de abatedouros Iranianos, e nele foi constatado a presença de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, ou seja as três espécies que possuem caráter zoonótico. Das 540 cepas, 73% eram *A. butzleri*, 9% eram *A. cryaerophilus* e apenas 4,1% eram *A. skirrowii*. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos na nossa pesquisa, com predomínio da espécie *A. butzleri* em 35/55, seguido de *A. cryaerophilus* com 20/55 cepas.

O isolamento de *A. butzleri* já foi descrito em reservatórios animais como aves e mamíferos vivos, mortos, saudáveis ou doentes (COLLADO; FIGUERAS, 2011). A carne de frango tem sido apontada como um dos principais veiculadores do agente para os seres humanos Ridsdale, Atabay e Corry (1998). *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* tem sido referidos como os principais isolados de carnes de frango (ATABAY; CORRY, 1997; ATABAY; CORRY; ON, 1998). Em 2011, um grupo de pesquisa da Costa Rica relatou o primeiro isolamento de *A. butzleri* no país a partir de carcaças de frango (ARIAS; CID; FERNANDÉZ, 2011).

A distribuição de *Arcobacter* no Município de São Paulo apresentou algumas diferenças regionais. Não houve ocorrência de *A. cryaerophilus* na Zona Sul, mas a frequência de *A. butzleri* foi semelhante a das outras regiões estudadas. Esta diferença na frequência do agente precisa ser melhor investigada, sob o ponto de vista epidemiológico, pois o número amostral deste trabalho, bem como a distribuição dos pontos de coleta não foram planejados de modo a determinar a morbidade prevalente do agente. O objetivo deste trabalho não foi comparar as prevalências, mas apenas relatar a ocorrência de espécies patogênicas demonstrando uma ampla distribuição do agente no Município. A ausência de *A. cryaerophilus* na Zona Sul foi um dado inesperado e requer uma investigação mais detalhada.

A cadeia epidemiológica das infecções por *Arcobacter* spp. ainda não foi completamente elucidada e ainda não está claro o papel das aves de produção como fontes de infecção da doença. Em 2013 foi realizada uma pesquisa de prevalência do agente em um abatedouro na Dinamarca, em que observaram a presença de 32/235 (13.6%) amostras positivas, sendo 29/32 provenientes da linha de evisceração. Todas essas amostras foram coletadas no dia do abate, contudo foram encontradas duas amostras positivas dois dias após a limpeza dos

equipamentos, o que sugere a formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável do estabelecimento (RASMUSSEN et al., 2013).

No Japão foi conduzido um trabalho sobre a prevalência do agente em produtos de origem animal no varejo, e observou-se 23% de positividade em carnes de frangos, 7% em carne de suínos e 2,2% em carne bovina, sendo que todas as carnes apresentaram *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (KABEYA et al., 2004). Esses resultados, assim como os que apresentamos nesta pesquisa, apontam mais uma vez para a importante participação da carne de frango como veiculador de *Arcobacter* com potencial patogênico.

Considera-se significativa relevância à Saúde Pública a presença do agente nos produtos de origem animal, uma vez que se trata de um patógeno emergente e com caráter zoonótico (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2006). De acordo com a Instrução Normativa-62 de 26/08/2003, há métodos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal, e no mesmo documento, são descritos micro-organismos de importância à saúde, contudo não consta o agente *Arcobacter* no manuscrito, provavelmente pelo fato de ser um agente ainda em estudos (BRASIL, 2015).

As espécies *Arcobacter butzleri* (65,4%) e *Arcobacter cryaerophilus* (34,5%) encontradas neste trabalho foram submetidas à pesquisa dos genes de virulência: *cadF* (proteína de fibronectina), *ciaB* (invasão), *cj1349* (proteína de fibronectina), *pldA* (lise de eritrócitos), *mvi* (biossíntese de peptideoglicano), *tlyA* (hemolisina), *hecB* (codifica ativação da proteína hemolisina), *hecA* (filamentos de hemaglutinina que envolve ataque, agregação e morte celular) e *irgA* (regulador de proteína para aquisição de ferro) (DOUIDAH et al., 2012; KARADAS et al., 2013).

Os genes *ciaB* e *mviN* foram detectados em 100% (55/55) dos isolados; *cj1349* foi detectado em 98.1% (54/55), seguidos de *pldA* 94.5% (52/55), *tlyA* 92.7% (51/55) e *cadF* 72.7% (40/55). Os genes *hecA* e *irgA* foram detectados em 47.2% (26/55) e 34.5% (19/55) respectivamente, e o fator de virulência com menor positividade foi o codificador de hemolisina *hecB* em 34.5% dos isolados (19/55) (Tabela 3).

Os fatores de virulência estudados são homólogos aos de *Campylobacter* e outras bactérias como *E. coli* e *Vibrio* spp. Apenas a espécie *A. butzleri* possui registrado um conjunto de genes de virulência bem estabelecidos (DOUIDAH et al., 2012). Neste trabalho foi possível identificar a presença dos nove genes propostos

em pelo menos uma das cepas de *A. cryaerophilus* e de *A. butzleri* isolados da carne de frango de diferentes locais.

No trabalho conduzido detectamos As cepas de *Arcobacter butzleri* apontaram 100% de amostras positivas para *ciaB*, *cj1349* e *mvn*; 97.2% para *pldA*, 94.2% *tlyA*, 74.2% *cadF*, 45.7% *hecA* e 40% para *irgA* e *hecB*. Nas cepas de *Arcobacter cryaerophilus* os genes se distribuíram da seguinte maneira: 100% para *ciaB* e *mvn*, 95% *cj1349*, 90% para *pldA* e *tlyA*, 70% *cadF*, 60% *irgA*, 55% *hecA* e 25% para *hecB* (Tabela 4).

Em uma pesquisa sobre diversidade genética de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* em carnes bovinas, suínas e de frango, foi revelado que 100% das cepas de *A. butzleri* apresentavam o gene *tlyA*. e 100% das cepas de *A. cryaerophilus* apresentaram o gene *ciaB*. As cepas de *A. cryaerophilus* provenientes de carne de frango não apresentaram nenhum outro fator de virulência, enquanto as de *A. butzleri* também isolados de frango apresentaram 90% de *cadF*, 71% *cj1349*, 100% *ciaB*, 53% *irgA*, 34% *hecA*, 48% *hecB*, 93% *pldA* e 98% de *mvn* (ZACHAROW, I.; BYSTRON, J.; WALECKA-ZACHARSKA, E.; PODKOWIK, M.; BANIA, 2015). Embora exista uma divergência entre o perfil de virulência de *A. cryaerophilus* relatado por Zacharow et al. (2015) e os obtidos neste trabalho, a diversidade genética relatada pelos autores também foi observada neste estudo. O agrupamento dos genes de virulência pesquisados resultou em 21 perfis de virulência distintos (Tabela 5).

Os grupos denominados G1 e G2 nesta pesquisa, foram os que tiveram maior número de isolados (7), com a combinação de 8 e 6 genes respectivamente e o G4 com 4 isolados apresentaram os nove fatores de virulência. Oito grupos tiveram um isolado para cada perfil (G14 ao G21), assim como cinco grupos apresentaram 2 isolados por perfil (G9 ao G13), dois grupos com 3 isolados (G7 e G8), três grupos com 4 isolados (G4 ao G6) e um grupo com 5 isolados (G3) (Tabela 5).

Em outro trabalho realizado na Alemanha, foram estudadas amostras de carne de peixe, porco e frango, e neste foram isolados *A. butzleri* da carne de frangos e o mesmo apresentou 100% de positividade para os genes *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mvn* e *pldA*, que são fatores com importante participação na patogenicidade das cepas (LEHMANN, et al., 2015). No presente trabalho foram detectados 100% de positividade para os genes *ciaB* e *mvn* em *A. cryaerophilus*; e *ciaB*, *cj1349* e

mvnN para *A. butzleri*, conferindo os fatores relacionados a marcação de virulência (*mvnN*), adesão e invasão (*cj1349* e *ciaB* respectivamente), como genes relevantes para a virulência de *Arcobacter*.

Apesar da virulência de *Arcobacter* spp. ser pouco elucidada, a capacidade de adesão e invasão são consideradas fundamentais na patogenicidade do agente (COLLADO et al., 2011). Levican et al. (2013) realizaram ensaio de cultivo celular (Caco-2) de amostras de *A. butzleri* isolados de carnes de bovina, de frango, suína e de pato, e observaram aderência em 100% dos isolados. A presença ou ausência de um grupo de fatores de virulência parece estar correlacionada com a espécie investigada, sendo que ausência dos genes *ciaB*, *irgA*, *hecA*, *cj1349* e *cadF* comum em cepas de *Arcobacter thereius*, *Arcobacter mytilie*, *Arcobacter cibarius*. Estas espécies são menos virulentas devido à incapacidade de invasão nas células, diferentemente do que ocorre com *A. skirrowii*, cuja presença de *ciaB*, *hecA*, *cj1349* e *cadF* facilita o processo de forte adesão e invasão.

Musmanno et al. (1997) observaram uma cepa de *A. butzleri* (1/17) proveniente de amostras de água que apresentou efeito citotóxico (arredondamento celular e picnose nuclear) associado à adesão firme. Conlan et al. (2007) levantaram a hipótese da ação hemolítica do agente no organismo seja intensificada pela presença do gene estrutural *pldA* codificador da membrana de fosfolipase A. Neste estudo 94.5% (53/55) dos isolados possuem este gene. Este dado poderá ser melhor investigado em trabalhos prospectivos em cultivo celular ou em outros modelos experimentais de avaliação da expressão gênica.

Para esclarecimento da expressão dos genes de virulência, tem se desenvolvido pesquisas *in vivo* e *in vitro*. Em ensaio experimental utilizando inoculação de 1 mL de caldo à 10^2 - 10^{10} de *Arcobacter butzleri* e *A. cryaerophilus* em diferentes grupos de ratos, foi observado que todos os animais apresentaram emagrecimento progressivo, perda de apetite, diarreia aquosa sem a presença de sangue e com duração de 3 semanas, sendo auto limitante e não recebendo tratamento específico. Relatam também que doses de 10^3 UFC/mL provocam diarreia leve, enquanto doses acima de 10^6 UFC/mL provocam alterações patológicas intestinais significativas (ADESIJI, 2010).

Os genes pesquisados neste estudo estão associados aos fatores encontrados em cepas provenientes de humanos de diversas origens do mundo, como é destacado no trabalho realizado por Tabatabaei et al. (2014), que

descrevem a presença de *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowi* em alimentos de origem animal do Sul do Iran. Segundo os autores, a presença dos seis (*cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviN*, *pldA* e *tlyA*) fatores de virulência confere importância zoonótica ao patógeno.

Em novembro de 2013, nos Estados Unidos, foi relatado um caso de um paciente de 85 anos com Leucemia linfocítica crônica, apresentando sintomas de hipotensão, febre e histórico de diarreia persistente que havia começado há 4 semanas após uma viagem de cruzeiro a Europa. Foi diagnosticado *Arcobacter* como agente causador da diarreia e da bacteremia. O paciente permaneceu internado por 14 dias, recebendo fluidoterapia e tratamento com Vancomina e Piperacilina-tazobactam. No segundo dia a diarreia cessou e no terceiro dia a bacteremia também foi resolvida, o que demonstra a sensibilidade do agente aos antimicrobianos utilizados (ARGUELLO et al., 2015).

Ainda não é possível fazer uma correlação direta entre a patogenicidade do agente em relação à idade, sexo, localização geográfica e sensibilidade de todos os hospedeiros. Atualmente existem diversos relatos de casos que nos auxiliam no esclarecimento de evidências da patogênese do *Arcobacter*, como os dados obtidos na Austrália em um paciente com diarreia persistente (6 meses), em crianças da Itália com histórico de vômito e dor abdominal, na Alemanha em adultos com histórico de abuso de álcool e diabetes mellitus, no Chile em crianças com diarreia mucosa, dor abdominal e vômito, na Bélgica em um idoso com diarreia crônica, em um rapaz de 30 anos na Turquia, apresentando sudorese, dor abdominal, vômito e diarreia aquosa e na Espanha em um jovem com diarreia aquosa e com sangue (TEE et al., 1988; VANDAMME et al., 1992a; LERNER; BRUMBERGER; PREACMURSIC, 1994; FERNÁNDEZ; KRAUSE; VILLANUEVA, 2004; KAYMAN et al., 2012; WYBO et al., 2004; FIGUERAS et al., 2014).

Podemos analisar também os relatos de infecção extra-intestinal, como o caso de um neonato que nasceu com 29 semanas, decorrente de uma gravidez complicada, em que a mãe teve hemorragia no útero. O bebê apresentava após o nascimento hipotensão, hipotermia e hipoglicemia. Amostras de sangue foram coletadas para pesquisa microbiológica e dentre os agentes encontrados, *Arcobacter butzleri* estava presente, sugerindo que a criança se infectou ainda no útero da mãe (ON; STACEY; SMYTH, 1995).

Entretanto, ainda consideramos os alimentos de origem animal como a principal via de transmissão do agente. As más práticas de manejo e as falhas de higiene na manipulação dos alimentos nas fases secundárias e terciárias da cadeia produtiva de produtos de origem animal podem aumentar o risco de contaminação, deixando susceptíveis os consumidores que ingerirem carne de frango sem a adequada inocuidade (FERNÁNDEZ; KRAUSE; VILLANUEVA, 2004; FERREIRA et al., 2013).

Nesta fase do trabalho ainda não é possível determinar em qual elo da produção a carne de frango é contaminada, mas podemos levantar a hipótese de um novo agente de importância à atenção da vigilância sanitária e inspeção de produtos de origem animal. Observa-se que a taxa de positividade obtida neste trabalho é significativa, considerando que são alimentos que deveriam ter inocuidade garantida, uma vez que se encontram no último setor antes de chegar ao consumidor.

Visando melhor esclarecimento sobre a origem dos isolados e suas características epidemiológicas, foi realizada a análise genotípica através da técnica de AFLP, onde foram gerados os dendogramas da espécie *A. butzleri* e da espécie *A. cryaerophilus*.

Os perfis de *A. cryaerophilus* demonstram maior heterogeneidade quando comparado com *A. butzleri*. Alguns isolados de *A. cryaerophilus* provenientes do mesmo açougue e as amostras coletadas no mesmo ano apresentaram-se dispostas em perfis genotípicos completamente diferentes, como os isolados provenientes do açougue AC 74 e AC 75, que apesar de terem um local de coleta em comum, se distribuíram entre cinco perfis genotípicos distintos (C1, C7, C11, C12 e C14), apresentando perfis de virulência completamente diferentes.

Os perfis de *A. butzleri* também revelam heterogeneidade, sem um agrupamento comum entre isolados da mesma coleta. O perfil denominado B5 agrupou isolados com alta similaridade, apesar das amostras terem sido coletadas em anos diferentes, serem provenientes de açougues e regiões distintas e apresentarem perfis de virulência variados. No entanto, o padrão B14, agrupou isolados com alta similaridade, coletadas no mesmo estabelecimento e no mesmo ano, mas com variabilidade do perfil de virulência. Ainda no mesmo dendograma é possível observar um grupo homogêneo (perfil B10), composto por dois isolados que possuem elevada similaridade, sendo as amostras coletadas no mesmo local e ano, com o mesmo perfil de virulência.

A técnica de AFLP tem sido usada para analisar genomas de diferentes organismos, nos quais é realizado a detecção seletiva de fragmentos, revelando assim cepas com determinadas semelhanças ou diferenças, distribuídas em locais variados ou no mesmo ambiente (SAVELKOUL, 1999). O método tem se mostrado sensível para investigações epidemiológicas, como a pesquisa realizada em frangos abatidos na Nigéria, em que foram reconhecidos 12 perfis genotípicos com nível de similaridade de 90%, entre 20 *A. butzleri* estudados provenientes de um mesmo local de coleta (AMISU et al., 2003).

O uso da técnica de AFLP para estudo de *Arcobacter* está difundido em diversos grupos de pesquisa como o trabalho desenvolvido na Dinamarca, no qual foram investigados 73 cepas de *A. butzleri* provenientes de diferentes localizações geográficas e seus resultados corroboram com os encontrados em nossa pesquisa, uma vez que concluíram que as cepas possuem grande diversidade genética, apresentando múltiplos genótipos (51/73) (ON et al., 2004).

No Brasil, estudos sobre *Arcobacter* em amostras de carcaça de frangos têm sido realizados apenas por grupos de pesquisa da região Sul do país, o que reforça a importância de novos estudos na área. Apesar de pouco elucidado os pontos de contaminação de produtos origem animal com *Arcobacter* e sua relação com impacto à Saúde Pública, é possível relacioná-lo com a presença de genes de virulência de cepas encontrados em amostras de origem humana e animal, reforçando o caráter zoonótico do agente.

7 CONCLUSÕES

- ✓ *Arcobacter* spp. foi isolado nos cortes de asa, coxa, sobrecoxa e peito de frangos comercializados em açougues e Mercados Municipais das diferentes regiões de São Paulo.
- ✓ A espécie *A. butzleri* foi isolada com maior frequência, seguida por *A. cryaerophilus*. Não houve isolamento de *A. skirrowii*
- ✓ Os dados desse trabalho demonstraram elevada ocorrência dos genes de virulência propostos para as duas espécies encontradas, o que sugere um possível potencial patogênico.
- ✓ Os fatores de virulência com maior positividade foram *cj1349* (proteína de fibronectina), *ciaB* (invasão), *mviN* (biossíntese de peptidoglicano), *pldA* (lise de eritrócitos) e *tlyA* (hemolisina).
- ✓ Obteve-se maior número de isolados com a combinação dos genes *ciaB*, *cj1349*, *hecA*, *irgA*, *mviN*, *cadF*, *pldA*, *tlyA* (G1) e *ciaB*, *cj1349*, *mviN*, *cadF*, *pldA*, *tlyA* (G2).
- ✓ O AFLP revelou 19 padrões (perfis genotípicos) de *A. butzleri* e 17 de *A. cryaerophilus*, sendo que ambas as espécies apresentam alta heterogeneidade.
- ✓ Novos estudos de patogenicidade e expressão gênica poderão contribuir para o melhor entendimento e controle das infecções causadas por *Arcobacter* spp..

REFERÊNCIAS

- ABDELBAQI, K.; BUISSONNIÈRE, A.; PROUZET-MAULEON, V.; GRESSER, J.; WESLEY, I.; MÉGRAUD, F.; MÉNARD, A. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3015–3021, 2007.
- ADESIJI, Y. O. Faecal shedding of *Arcobacter* species following experimental infection in rats: Public health implications. **Central European Journal of Medicine**, v. 5, n. 4, p. 470–474, 2010.
- AMISU, K. O.; COKER, A. O.; ON, S. L. W.; ISOKPEHI, R. D. *Arcobacter butzleri* strains from poultry abattoir effluent in Nigeria. **East African Medical Journal**, v. 80, n. 4, p. 218–222, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2014**, p. 55, 2014. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: 19 out. 2015.
- ARGUELLO, E.; OTTO, C. C.; MEAD, P.; BABADY, N. E. Bacteremia caused by *Arcobacter butzleri* in an immunocompromised host. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1448–1451, 2015.
- ARIAS, M. L.; CID, A.; FERNANDÉZ, H. *Arcobacter butzleri*: first isolation report from chicken carcasses in Costa Rica. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 2011, p. 703–706, 2011.
- ATABAY, H. I.; BANG, D. D.; AYDIN, F.; ERDOGAN, H. M.; MADSEN, M. Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, p. 141–145, 1998.
- ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. **Journal Applied Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 619–626, 1997.
- ATABAY, H. I.; CORRY, J. E.; ON, S. L. Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 1007–16, 1998.
- ATANASSOVA, V.; KESSEN, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Incidence of *Arcobacter* spp. in Poultry: Quantitative and Qualitative Analysis and PCR Differentiation. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2533–2536, 2008.
- BASTYNS, K.; CHAPELLE, S.; VANDAMME, P.; GOOSSENS, H.; DE WACHTER, R. Species-specific detection of Campylobacters important in veterinary medicine by PCR amplification of 23S rDNA areas. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 563–568, 1995.
- BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso**, v. 2, n. 1, p. 25–51, 2010.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495–503, 1990.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. e A. **Manual de legislação: programas nacionais de saúde animal no Brasil**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009.

BROOKS, F.; CARROLL, K.; BUTEL, S.; MORSE, S. . **Microbiologia médica**. 26 ed., Ed. Artmed, 2012.

COLLADO, L.; CLEENWERCK, I.; VAN TRAPPEN, S.; DE VOS, P.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1391–1396, 2009.

COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 174–192, 13 jan. 2011. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00034-10>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

COLLADO, L.; KASIMIR, G.; PEREZ, U.; BOSCH, A.; PINTO, R.; SAUCEDO, G.; HUGUET, J. M.; FIGUERAS, M. J. Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. **Water Research**, v. 44, n. 12, p. 3696–3702, 2010.

COLLADO, L.; LEVICAN, A.; PEREZ, J.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 2155–2161, 2011.

COMISSÃO INTERNACIONAL DE ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS PARA ALIMENTOS (ICMSF). Guia simplificado para a compreensão e uso de objetivos de inocuidade de alimentos e objetivos de desempenho. **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)**, p. 1–15, 2006. Disponível em: <[http://www.icmsf.org/pdf/FSO Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf](http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf)>. Acesso em: 9 set. 2015.

CONLAN, A. J. .; COWARD, C.; GRANT, A. J.; MASKELL, D. J.; GOG, J. R. *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 4, n. 16, p. 819–829, 2007.

DASTI, J. I.; TAREEN, A. M.; LUGERT, R.; ZAUTNER, A. E.; GROS, U. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 4, p. 205–211, 2010.

DE OLIVERIA, S. J.; WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L.; HARMON, K. M.; KADER, I. I. T. A.; DE UZEDA, M. *Arcobacter Cryaerophilus* and *Arcobacter Butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 5, p. 462–464, 1 set. 1999.

DE SMET, S.; VANDAMME, P.; DE ZUTTER, L.; ON, S. L. W.; DOUIDAH, L.; HOUF, K. *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 356–361, 2011.

DONACHIE, S. P.; BOWMAN, J. P.; ON, S. L. W.; ALAM, M. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2005, p. 1271–1277, 2005.

DOUIDAH, L.; DE ZUTTER, L.; BARE, J.; DE VOS, P.; VANDAMME, P.; VANDENBERG, O.; VAN DEN ABEELE, A.-M.; HOUF, K. Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 735–741, 2012.

- DOUIDAH, L.; DE ZUTTER, L.; VAN NIEUWERBURGH, F.; DEFORCE, D.; INGMER, H.; VANDENBERG, O.; VAN DEN ABEELE, A.-M.; HOUF, K. Presence and analysis of plasmids in human and animal associated arcobacter species. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e85487, 2014.
- DOUIDAH, L.; DE ZUTTER, L.; VANDAMME, P.; HOUF, K. Identification of five human and mammal associated Arcobacter species by a novel multiplex-PCR assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 3, p. 281–286, 2010.
- DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A. de; FALCÃO, L. S. P. da C. de A. Occurrence of Salmonella spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569–573, 2009.
- EIFERT, J. D.; CASTLE, R. M.; PIERSON, F. W.; LARSEN, C. T.; HACKNEY, C. R. Comparison of sampling techniques for detection of Arcobacter butzleri from chickens. **Poultry Science**, v. 82, n. 12, p. 1898–1902, 2003.
- ESMAILE, F.; LIMA, D. S.; DUGAICH, I. B.; JULIANA, S. I.; ROSSATO, M.; CÉSAR, A.; CRISTINA, I. K.; BRITO, T. de; GUIMARÃES, I. B. Antimicrobial susceptibility and pathogenicity of Escherichia coli strains of environmental origin. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, p. 1249–1255, 2014.
- FERNÁNDEZ, H.; KRAUSE, S.; VILLANUEVA, M. P. Arcobacter butzleri an emerging enteropathogen: Communication of two cases with chronic diarrhea. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 216–218, 2004.
- FERREIRA, S.; FRAQUEZA, M. J.; QUEIROZ, J. a.; DOMINGUES, F. C.; OLEASTRO, M. Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of Arcobacter butzleri isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 82–88, 2013.
- FERREIRA, S.; JÚLIO, C.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C.; OLEASTRO, M. Molecular diagnosis of Arcobacter and Campylobacter in diarrhoeal samples among Portuguese patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 3, p. 220–5, 2014a.
- FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; OLEASTRO, M.; DOMINGUES, F. C. Genotypic and phenotypic features of Arcobacter butzleri pathogenicity. **Microbial Pathogenesis**, v. 76C, p. 19–25, 2014b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218724>>.
- FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; OLEASTRO, M.; DOMINGUES, F. C. Insights in the pathogenesis and resistance of Arcobacter : A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 7828, p. 1–20, 2015.
- FIGUERAS, M. J.; COLLADO, L.; LEVICAN, A.; PEREZ, J.; SOLSONA, M. J.; YUSTES, C. Arcobacter molluscorum sp. nov., a new species isolated from shellfish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 105–109, 2011a.
- FIGUERAS, M. J.; LEVICAN, A.; COLLADO, L.; INZA, M. I.; YUSTES, C. Arcobacter ellisii sp. nov., isolated from mussels. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 414–418, 2011b.

- FIGUERAS, M. J.; LEVICAN, A.; PUJOL, I.; BALLESTER, F.; RABADA QUILEZ, M. J.; GOMEZ-BERTOMEU, F. A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. **New Microbes and New Infections**, v. 2, n. 2, p. 31–7, 2014.
- GOLDBERG, M. B.; DIRITA, V. J.; CALDERWOOD, S. B. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using *TnphoA* mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 1, p. 55–60, 1990.
- GONZALEZ, I.; GARCIA, T.; FERNANDEZ, S.; MARTIN, R. Current Status on *Arcobacter* Research: An Update on DNA-Based Identification and Typing Methodologies. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 956–968, 2012.
- GRAV, J. A.; NERI, M. C.; NETO, F. C.; GOMES, J. D. M.; RESENDE, M.; RODRIGUES, A. P. Oferta e demanda de frango de corte no Brasil. **Análise Econômica**, v. 10, n. 17, p. 117–126, 1992.
- HAMILL, S.; NEILL, S. D.; MADDEN, R. H. A comparison of media for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail packs of beef. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 850–4, 2008.
- HARRASS, B.; SCHWARZ, S.; WENZEL, S. Identification and characterization of *Arcobacter* isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 45, n. 2, p. 87–94, 1998.
- HO, H.; LIPMAN, L.; GAASTRA, W. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 1–13, 2006.
- HO, H. T. K.; LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 223–229, 2008.
- HO, H. T. K.; LIPMAN, L. J. A.; HENDRIKS, H. G. C. J. M.; TOOTEN, P. C. J.; ULTEE, T.; GAASTRA, W. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 51–8, jun. 2007.
- HOUF, K.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 8, p. 1233–1239, 2002a.
- HOUF, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F.; VANDENBERG, O.; BUTZLER, J.-P.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 3, p. 243–7, 2004.
- HOUF, K.; ON, S. L. W.; COENYE, T.; DEBRUYNE, L.; DE SMET, S.; VANDAMME, P. *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2599–2604, 2009.
- HOUF, K.; ON, S. L. W.; COENYE, T.; MAST, J.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 713–717, 2005.

HOUF, K.; TUTENEL, A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, n. 1, p. 89–94, 2000.

HOUF, K.; ZUTTER, L. de; HOOFF, J. Van; VANDAMME, P. Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2172–2178, 2002b.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems : an application of Simpson ' s index of Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems : an Application of Simpson ' s Index of Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465–2466, 1988.

INOUE, A.; MURATA, Y.; TAKAHASHI, H.; TSUJI, N.; FUJISAKI, S.; KATO, J. I. Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 7298–7301, 2008.

ISTIVAN, T. S.; COLOE, P. J. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. **Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 1263–1274, 2006.

JOHNSON, J. R.; JELACIC, S.; SCHOENING, L. M.; CLABOTS, C.; SHAIKH, N.; MOBLEY, H. L. T.; TARR, P. I. The *IrgA* homologue adhesin *Iha* is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 2, p. 965–71, 2005.

JOHNSON, L. G.; MURANO, E. A. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 456–462, 1999.

JUNIOR, C. J.; PAULA, S. R. L. de; ORMOND, J. G. P.; BRAGA, N. M. A cadeia da carne de frango: tensões, desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v. 1, n. 26, p. 191–232, 2007.

KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; OHSUGA, T.; OZAWA, S.; KOBAYASHI, Y.; ABE, M.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 303–308, 2004.

KARADAS, G.; SHARBATI, S.; HÄNEL, I.; MESSELHÄUSSE, U.; GLOCKER, E.; ALTER, T.; GÖLZ, G. Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 583–590, 2013.

KAYMAN, T.; ATABAY, H. I.; ABAY, S.; HIZLISOY, H.; MOLVA, Ç.; AYDIN, F. Human acute gastroenteritis associated with *Arcobacter butzleri*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 34, n. 24, p. 197–199, 2012.

KHOSHBAKHT, R.; TABATABAEI, M.; SHIRZAD ASKI, H.; SEIFI, S. Occurrence of *Arcobacter* in Iranian poultry and slaughterhouse samples implicates contamination by processing equipment and procedures. **British Poultry Science**, v. 55, n. 6, p. 732–736, 2014.

KIEHLBAUCH, J. A.; BRENNER, D. J.; NICHOLSON, M. A.; BAKER, C. N.; PATTON, C. M.; STEIGERWALT, A. G.; WACHSMUTH, I. K. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 376–385, 1991.

KIM, H. M.; HWANG, C. Y.; CHO, B. C. *Arcobacter marinus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 531–6, 2010.

KONKEL, M. E.; GRAY, S. A.; KIM, B. J.; GARVIS, S. G.; YOON, J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 510–7, 1999.

LEHMANN, D.; ALTER, T.; LEHMANN, L.; UHERKOVA, S.; SEIDLER, T.; GOLZ, G. Prevalence, virulence gene distribution and genetic diversity of *Arcobacter* in food samples in Germany. **Berliner und Munchener Tierartliche Wochenschrift**, v. 4, p. 163–168, 2015.

LERNER, J.; BRUMBERGER, V.; PREACMURSIC, V. Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 8, p. 660–662, 1994.

LEVICAN, A.; ALKESKAS, A.; GUNTER, C.; FORSYTHE, S. J.; FIGUERAS, M. J. Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4951–4957, 14 jun. 2013.

LEVICAN, A.; COLLADO, L.; AGUILAR, C.; YUSTES, C.; DIÉGUEZ, A. L.; ROMALDE, J. L.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 133–138, 2012.

LEVICAN, A.; COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 22–27, 2013.

LEVICAN, A.; RUBIO-ARCOS, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.; COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 30–35, 2015.

LIPMAN, L.; HO, H.; GAASTRA, W. The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens. **Poultry science**, v. 87, n. 11, p. 2404–7, 2008.

MARTINO, M. C.; STABLER, R. A.; ZHANG, Z. W.; FARTHING, M. J. G.; WREN, B. W.; DORRELL, N. *Helicobacter pylori* pore-forming cytolysin orthologue *tlyA* Possesses in vitro hemolytic activity and has a role in colonization of the gastric mucosa. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1697–1703, 2001.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 21–28, 2000.

MENDES, P. M. **Avaliação da estabilização de camas usadas na avicultura através de bioindicadores vegetais**. 2011, 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

MILLER, W. G.; PARKER, C. T.; RUBENFIELD, M.; MENDZ, G. L.; WÖSTEN, M. M. S. M.; USSERY, D. W.; STOLZ, J. F.; BINNEWIES, T. T.; HALLIN, P. F.; WANG, G.; MALEK, J. A.; ROGOSIN, A.; STANKER, L. H.; MANDRELL, R. E. The complete genome sequence and analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. e1358, 2007.

MURANO, E. A. Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1789–1795, 2002.

NEUBAUER, C.; HESS, M. Detection and identification of food-borne pathogens of the genera *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* by multiplex PCR in poultry and poultry products. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, p. 376–381, 2006.

OLIVEIRA, S. J. DE; MORAES, H. L. S.; KUCHENBECKER, B. S.; IKUTA, N.; LUNGE, V.; FONSECA, A.; COIRO, J. R. Isolation of *Arcobacter* spp from poultry carcasses, in Brazil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 639–643, 2001.

ON, S. L.; STACEY, A.; SMYTH, J. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. **The Journal of Infection**, v. 31, n. 3, p. 225–7, 1995.

ON, S. L. W.; ATABAY, H. I.; AMISU, K. O.; COKER, A. O.; HARRINGTON, C. S. Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 347–352, 2004.

RAHIMI, E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. **British Poultry Science**, p. 37–41, 2014.

RAHMAN, M. A.; SOBIA, P.; DWIVEDI, V. P.; BHAWSAR, A.; SINGH, D. K.; SHARMA, P.; MOODLEY, P.; VAN KAER, L.; BISHAI, W. R.; DAS, G. Mycobacterium tuberculosis TlyA Protein Negatively Regulates T Helper (Th) 1 and Th17 Differentiation and Promotes Tuberculosis Pathogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 23, p. 14407–14417, 2015.

RASMUSSEN, L. H.; KJELDGAARD, J.; CHRISTENSEN, J. P.; INGMER, H. Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 322, 2013.

RIDSDALE, J. A.; ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. L. Prevalence of campylobacters and arcobacters in ducks at the abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 567–573, 1998.

RODRIGUES, R. Relatório técnico e de atividades 2013 Embrapa Suínos e Aves. **Embrapa**, p. 5–81, 2014.

ROJAS, C. M.; HAM, J. H.; DENG, W.-L.; DOYLE, J. J.; COLLMER, A. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13142–7, 2002.

ROSSI, ANTÔNIO AUGUSTO ; PADILHA, MARÍLIA TEREZINHA SANGOI; SANTOS, IONE IOLANDA DO; PADILHA, J. C. F. Uso de probiótico na prevenção de Salmoneloses em frangos de corte. **Ciência Agrotecnica**, v. 31, p. 1207–1211, 2007.

RUIZ, N. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 40, p. 15553–7, 2008.

SALAŃASZYŃSKA-GUZ, A.; KLIMUSZKO, D. Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* cj0183 and cj0588 genes. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 592–596, 2008.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; BARRETT, L. J.; POWELL, S. M.; GUERRANT, R. L. Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. **The Journal of Infection**, v. 54, n. 6, p. 558–66, 2007.

SASI JYOTHSNA, T. S.; RAHUL, K.; RAMAPRASAD, E. V. . V.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4619–4625, 2013.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; HASS, J.; DIJKHOORN, I.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083–3091, 1999.

SERRAINO, A.; GIACOMETTI, F.; DAMINELLI, P.; LOSIO, M. N.; FINAZZI, G.; MARCHETTI, G.; ZAMBRINI, A. V.; ROSMINI, R. Survival of *Arcobacter butzleri* during production and storage of artisan water buffalo mozzarella cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 9, p. 820–4, 2013.

SILVEIRA, C.; VAZ, L.; SU, E.; ANIMAL, S. *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. **Estudos da Embrapa**, n. 3, p. 6–9, 2008.

TABATABAEI, M.; ASKI, H. S.; SHAYEGH, H.; KHOSHBAKHT, R. Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 66, p. 1–4, 2014.

TANABE, T.; KATO, A.; SHIUCHI, K.; MIYAMOTO, K.; TSUJIBO, H.; MAKI, J.; YAMAMOTO, S.; FUNAHASHI, T. Regulation of the Expression of the *Vibrio parahaemolyticus* *peuA* Gene Encoding an Alternative Ferric Enterobactin Receptor. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105749, 2014.

TEE, W.; BAIRD, R.; DYALLSMITH, M.; DWYER, B. *Campylobacter-Cryaerophila* Isolated from a Human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 12, p. 2469–2473, 1988.

TINÔCO, I. F. F. Industrial aviculture: new concepts of materials, conceptions and constructive techniques available for Brazilian poultry houses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, p. 01–26, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2001000100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 ago. 2015.

- TIVENDALE, K. A.; ALLEN, J. L.; GINNS, C. A.; CRABB, B. S.; BROWNING, G. F. Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Society**, v. 72, n. 11, p. 6554–6560, 2004.
- TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**. 5^a. ed., p. 1-760, 2008.
- VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 1–46, 2007.
- VAN DEN ABEELE, A.-M.; VOGELAERS, D.; VAN HENDE, J.; HOUF, K. Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1746–1749, 2014.
- VAN DRIESSE, E.; HOUF, K. Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 744–751, 2007.
- VANDAMME, P.; PUGINA, P.; BENZI, G.; VAN ETTERIJCK, R.; VLAES, L.; KERSTERS, K.; BUTZLER, J. P.; LIOR, H.; LAUWERS, S. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2335–2337, 1992a.
- VANDAMME, P.; VANCANNEYT, M.; POT, B.; MELS, L.; HOSTE, B.; DEWETTINCK, D.; VLAES, L.; VAN DEN BORRE, C.; HIGGINS, R.; HOMMEZ, J. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 344–356, 1992b.
- VANDENBERG, O.; DEDISTE, A.; HOUF, K.; IBEKWEM, S.; SOUAYAH, H.; CADRANEL, S.; DOUAT, N.; ZISSIS, G.; BUTZLER, J. P.; VANDAMME, P. *Arcobacter* species in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1863–1867, 2004.
- WESLEY, I. V.; HARMON, K. M. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 97, p. 347–354, 1997.
- WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, J.; LAPEN, D. R.; WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, K.; TAMBONG, J. T.; ANDRÉ LÉVESQUE, C.; CLOUTIER, M.; TOPP, E.; VILLEMUR, R.; CHAO, J.; TALBOT, G.; XU, R.; ARTS, M. T.; ADAM, Z.; KHAN, I. U. H. *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 2709–2716, 2015.
- WIRSEN, C. O.; SIEVERT, S. M.; CAVANAUGH, C. M.; MOLYNEAUX, S. J.; AHMAD, a.; TAYLOR, L. T.; DELONG, E. F.; TAYLOR, C. D. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 316–325, 2002.
- WYBO, I.; BREYNAERT, J.; LAUWERS, S.; HOUF, K. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1851–1853, 2004.

ZACHAROW, I.; BYSTRON, J.; WALECKA-ZACHARSKA, E.; PODKOWIK, M.; BANIA, J. Genetic diversity and incidence of virulence-associated genes of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from pork , beef , and chicken Meat in Poland. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–6, 2015.